

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO- ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E CIÊNCIAS VISUAIS

**MARINA ROIZENBLATT**

**TOXICIDADE DE CORTICOIDES E BIOCIDAS EM CÉLULAS DA  
CÓRNEA: PESQUISA TRANSLACIONAL REVERSA E MEDICINA  
DE PRECISÃO EM OFTALMOLOGIA E CIÊNCIAS VISUAIS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Departamento de Oftalmologia e Ciências Visuais para obtenção do título de Mestrado Profissional em Ciências da Saúde, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ramos de Souza Carvalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Linda Christian Carrijo-Carvalho

**São Paulo**

**2016**

Roizenblatt, Marina

Toxicidade de Corticoides e Biocidas em Células da Córnea: Pesquisa Translacional

Reversa e Medicina de Precisão em Oftalmologia e Ciências Visuais/ Marina

Roizenblatt- São Paulo, 2016

Tese (Mestrado Profissional) – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia e Ciências Visuais.

Título em Inglês: Toxicity of Corticosteroids and Biocides in Corneal Cells: Reverse Translational Research and Precision Medicine in Ophthalmology and Visual Science

1. Córnea, 2. Ceratite, 3. Corticoide, 4. Biguanida, 5. *Acanthamoeba*, 6. Pesquisa Translacional, 7. Terapia

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	pág. 4
TÍTULO/AUTORES.....	pág. 5
RESUMO.....	pág. 6
ABSTRACT.....	pág. 8
INTRODUÇÃO.....	pág. 10
JUSTIFICATIVA.....	pág. 16
OBJETIVOS.....	pág. 20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	pág.21
RESULTADOS.....	pág. 24
DISCUSSÃO.....	pág. 31
ADEQUAÇÃO E PROMOÇÃO DO ESTUDO.....	pág. 33
CONCLUSÃO.....	pág. 34
ANEXO .....	pág. 35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pág. 36

## **1. APRESENTAÇÃO**

O curso de Mestrado Profissionalizante iniciou-se em Agosto de 2014 no Departamento de Oftalmologia com o objetivo de aprimorar os conhecimentos sobre o efeito *in vitro* de corticoides sob condição individual ou associados a compostos antimicrobianos em modelo de epitélio e estroma da córnea.

A aluna acompanhou durante este período o Laboratório de Protozoologia Ocular (LAPRO) da Escola Paulista de Medicina especializado em desenvolvimento de pesquisas internacionais multicêntricas na área de oftalmologia. O presente manuscrito apresenta revisão bibliográfica sobre o assunto estudado e o artigo científico produzido com base nos dados coletados durante o curso de mestrado profissionalizante.

## **ARTIGO**

**TÍTULO.** Toxicidade de Corticoides e Biocidas em Células da Córnea: Pesquisa Translacional Reversa e Medicina de Precisão em Oftalmologia e Ciências Visuais

## **AUTORES:**

Marina Roizenblatt

Annete S. Foronda

Linda C. Carrijo-Carvalho

Denise de Freitas

Fabio R. S. Carvalho

**INSTITUIÇÃO.** Departamento de Oftalmologia e Ciências Visuais – Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM

## 2. RESUMO

**INTRODUÇÃO.** As células epiteliais da córnea (HCEC) e os fibroblastos da córnea de coelho (SIRC) reproduzem o microambiente corneano em termos de epitélio e estroma, respectivamente. Estas células são ideais para o estudo da fisiopatologia da ceratite por *Acanthamoeba* spp (CA) *in vitro*. A CA representa um importante modelo experimental, uma vez que não existe um tratamento padronizado para esta patologia e elevada toxicidade é relatada com o uso de compostos anti-microbianos, tais como biguanidas, associados ou não aos corticoides.

**OBJETIVOS.** Estudar o efeito *in vitro* de corticoides sob condição individual ou associados ao composto antimicrobiano polihexametilbiguanida (PHMB) em modelo celular de epitélio e estroma da córnea

**MATERIAIS E MÉTODOS.** Células HCEC ou SIRC foram semeadas em placas de ensaio na concentração de  $2 \times 10^5$  / mL e tratadas com a adição de corticoides (Fosfato de Dexametasona a 0,1% ou Acetato de Prednisolona a 1,0%) e/ ou PHMB na concentração de 0,02% ou 0,04%. O metabolismo celular foi quantificado por meio da fluorescência emitida com a adição do reagente PrestoBlue®.

**RESULTADOS.** O metabolismo não diferiu entre as HCEC e SIRC quando comparado as 6 horas de exposição aos reagentes e o período de recuperação, em que as células foram incubadas sem os compostos químicos ( $p < 0,01$ ). A taxa metabólica de recuperação

aumentou na condição PHMB 0,02% somada a prednisolona quando aplicado às HCEC e na condição de PHMB 0,04% mais dexametasona quando aplicado às SIRC ( $p<0,05$ ). Meios suplementados com prednisolona ou dexametasona demonstraram ser menos tóxicos se comparados a PHMB em qualquer concentração isolada ou em associação aos corticosteroides ( $p<0,01$ ).

**DISCUSSÃO.** A literatura carece de dados objetivos quanto a toxicidade ocular da PHMB e / ou do corticoide no tratamento da CA. Demonstrou-se em ambiente experimental que a toxicidade da PHMB é maior do que a dos corticosteróides para as células do epitélio e estroma corneano e que a combinação dos dois fármacos não melhora esta condição. Após a retirada dos medicamentos do meio de cultura, observou-se recuperação no metabolismo celular.

**CONCLUSÃO.** O presente estudo contribui para evidenciar que a adição de corticosteróides não muda consideravelmente a toxicidade da PHMB às células da córnea. Além disso, PHMB 0,02% é preferível nos casos de terapia combinada.

### 3. ABSTRACT

INTRODUCTION: Human Corneal Epithelial Cells (HCEC) and Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC) reproduce the cornea microenvironment in terms of epithelium and stroma, respectively. These cells are ideal for the study of the pathophysiology of the *Acanthamoeba keratitis* (AK) *in vitro*. . As there is no standardized treatment for AK, it is important to develop a study model for this condition. In addition, considerable toxicity has been reported with the use of antimicrobial compounds such as biguanides and diamidines, associated or not to corticosteroids, for the management of AK.

OBJECTIVES. To study the *in vitro* the effect of isolated corticosteroids or associated with Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) in a cell model of the corneal epithelium and stroma.

MATERIALS AND METHODS. Cells of HCEC or SIRC were seeded into plates in the concentration of  $2 \times 10^5/\text{mL}$  and treated with the addition of corticosteroid (dexamethasone 0.1% or prednisolone 1.0%) or PHMB at the concentration of 0.02% or 0.04%, alone or associated with one of the above mentioned corticosteroids. Cell metabolism were quantified by fluorescence with the aid of PrestoBlue™

RESULTS. Metabolism did not differ between HCEC and SIRC after 6 hours and in the recovery period, in which cells were incubated without the chemical compounds



( $p < 0,01$ ). The metabolic rate of recovery increased in the PHMB 0.02% plus prednisolone condition for HCEC and PHMB 0.04% plus dexamethasone for SIRC ( $p < 0,05$ ). Media supplemented with prednisone or dexamethasone showed to be less toxic than PHMB in any concentration, alone or in association to corticosteroids ( $p < 0,01$ ).

**DISCUSSION.** The literature lacks objective data on the ocular toxicity of PHMB and / or corticosteroids in the treatment of CA. It has been demonstrated that the toxicity of PHMB is higher than that of steroids to cells of the epithelium and corneal stroma at an experimental environment, and that the combination of the two medications did not improve the condition. After removal of the drugs from the culture medium, it was observed a cellular metabolism recovery.

**CONCLUSIONS.** This study demonstrates that the addition of corticosteroids does not change considerably the toxicity of PHMB to the corneal cells. Notwithstanding, PHMB 0.02% is preferable in cases of combined therapy for AK.

#### 4. INTRODUÇÃO

As infecções oculares por amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* spp, principalmente a ceratite, se inserem como importante modelo de estudo aplicável à pesquisa translacional reversa e medicina de precisão no campo da oftalmologia e ciências visuais. A pesquisa translacional é o campo da ciência voltado à aplicabilidade dos achados científicos laboratoriais à prática clínica, proporcionando melhorias na oferta de serviços de saúde à comunidade. Por outro lado, a pesquisa translacional reversa busca identificar, a partir de estudos observacionais clínicos, um aspecto específico a ser investigado no âmbito da pesquisa laboratorial. Soma-se ao incremento das ciências médicas voltadas a melhoria na qualidade de saúde, a medicina de precisão, que busca investigar preditores de segurança e eficácia no processo terapêutico.

O segmento ocular externo, composto de pálpebras, conjuntiva, esclera e córnea, é parte crucial do organismo que está exposta ao meio ambiente. Essa porção do olho confere proteção contra o ambiente adverso e garante a transmissão do estímulo luminoso que posteriormente é processado no sistema nervoso central e interpretado nos tratos visuais.<sup>1</sup>

A córnea é uma estrutura esférica constituída de tecido transparente e avascular que mede de 11 a 12 mm horizontalmente e de 10 a 11 mm verticalmente. Sua nutrição se dá por meio da difusão de glicose proveniente do humor aquoso e da difusão de oxigênio originário do filme lacrimal e da circulação límbica. A córnea tem alta densidade de terminações nervosas, o que lhe confere uma sensibilidade 100 vezes maior que a da conjuntiva. Fibras nervosas sensoriais estendem-se ao longo dos nervos ciliares e

formam o plexo subepitelial <sup>1,2</sup>. Histologicamente, a córnea é composta de cinco camadas distintas: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio.

A visão clara requer epitélio corneano regular, estroma transparente e endotélio funcionante. A integridade da córnea é necessária para garantir superfície refrativa anterior adequada, proteger o olho contra infecções e, as estruturas mais profundas do olho contra danos estruturais <sup>2</sup>. Por ser vulnerável a agentes químicos, físicos e biológicos, a córnea é equipada de sistema de manutenção ativo responsável pela renovação de seu epitélio e cicatrização de lesões <sup>3</sup>.

A ceratite, ou seja, o processo infeccioso corneano, tem etiologia multifatorial. As causas microbianas da doença incluem agentes bacterianos, virais, fúngicos ou parasitários <sup>4</sup>. Descrita na década de 70 <sup>5,6</sup>, a ceratite por *Acanthamoeba* spp (CA) é uma infecção corneana rara, porém devastadora<sup>7</sup>. Um aumento no número de casos foi observado no início dos anos 80 devido à popularização do uso das lentes de contato gelatinosas <sup>8</sup>. Apesar de mais que 70% dos casos descritos estarem associados ao uso de lentes de contato <sup>8-10</sup>, a CA também se associa a traumas e à exposição a águas ou solo contaminados (em geral descrita em agricultores) e a traumas pós-cirúrgicos, incluindo ceratoplastia penetrante e ceratotomia radial <sup>9</sup>.

A taxa de incidência da CA varia de 0,15 por milhão nos Estados Unidos a mais de 1,4 por milhão na Inglaterra <sup>9</sup>. Após 1995 observou-se decréscimo na incidência de CA que se deve à melhoria das soluções para higienização e conservação das lentes de contato <sup>11</sup>. Atualmente, estima-se que a incidência anual de CA seja de 1 para 30 mil em usuários de lentes de contato gelatinosas em países europeus e asiáticos que tenham práticas semelhantes de higienização e conservação das lentes de contato <sup>12</sup>. No Brasil,

um estudo detectou prevalência de 1,9% de CA dentre as culturas de material corneano que eram positivas para infecção microbiana <sup>13</sup>.

*Acanthamoeba spp* possui duas formas distintas de apresentação: a cística e a trofozoítica. A forma cística, que torna o protozoário mais resistente, ocorre em condições de alta temperatura, desidratação e na presença de alguns desinfetantes químicos. O cisto mede de 18 a 25 micrômetros (µm), apresenta parede externa dupla, com junções esparsas entre as duas camadas, o que lhe confere a forma poligonal. Os trofozoítos, por sua vez, são detectados durante a multiplicação, a locomoção e a alimentação da ameba de vida livre <sup>14</sup>.

O diagnóstico de CA é norteado tanto por aspectos clínicos quanto laboratoriais <sup>14</sup>. Apesar de apresentar quadro clínico bem estabelecido, a CA é freqüentemente confundida com outras ceratites infecciosas, como a ceratite herpética, o que retarda o início do tratamento específico <sup>15</sup>.

Tanto a microscopia especular quanto a microscopia confocal são capazes de identificar o protozoário *in vivo* e podem ser empregadas na avaliação do resultado do tratamento clínico <sup>16, 17</sup>. Na visualização *in vivo*, os cistos apresentam características morfológicas circulares, esféricas ou, eventualmente, elípticas, e os trofozoítos são pleomórficos, ou seja, podem apresentar diferentes tamanhos e estruturas morfológicas irregulares <sup>2</sup>. A comprovação laboratorial é feita por meio da visualização do protozoário em esfregaços corados ou culturas de raspados corneanos <sup>9</sup> das lesões epiteliais e subepiteliais. O protozoário apresenta crescimento em diversos meios de cultura, porém o agar não nutriente é o mais utilizado por diminuir a proliferação bacteriana na ausência de nutrientes. A adição de camada de *Escherichia coli* mortas ao ágar serve de substrato

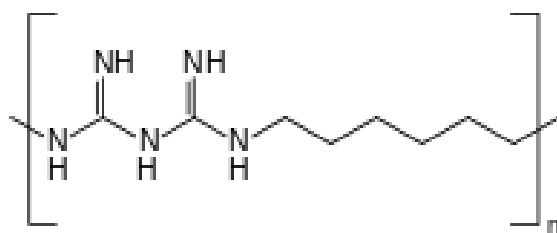
para a proliferação da ameba de vida livre <sup>14</sup>. Em casos de pouco acometimento epitelial e infecção estromal importante, a biopsia deve ser considerada <sup>18</sup>.

Além da dificuldade diagnóstica, outro aspecto importante da CA é a toxicidade das medicações utilizadas atualmente em seu tratamento, o que mais uma vez reforça a necessidade de diagnóstico preciso e precoce. São descritos diversos efeitos adversos do tratamento da CA, o que inclui: resistência do protozoário a um ou mais agentes químicos, o aumento da patogenicidade da *Acanthamoeba* spp induzida por esteróides e as mudanças estruturais de íris, cristalino e câmara anterior devido a terapia prolongada com agentes antimicrobianos em altas concentrações. Outro aspecto relevante a ser considerado é a toxicidade corneana induzida pelos conservantes utilizados da confecção das medicações empregadas no tratamento da CA, com ênfase no Cloreto de Benzalcônio, principal classe utilizada. Neste contexto, deve-se atentar para o tempo de exposição e concentração se optado pela utilização de drogas que contenham esse composto <sup>19-23</sup>.

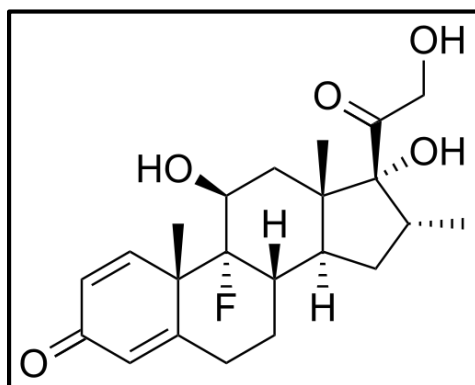
Apesar da descrição de diversos estudos envolvendo a avaliação *in vitro* e *in vivo* de numerosos agentes antimicrobianos na viabilidade do protozoário, não há consenso quanto à padronização do tratamento desta condição. Os relatos científicos, em geral, são controversos. Os principais biocidas utilizados na terapêutica de CA incluem antissépticos catiônicos e diamidinas aromáticas. No que se refere às medicações especificamente, a terapia contra a CA inclui a aplicação de componentes antimicrobianos como as Biguanidas, como a polihexametileno biguanida ou polihexanida (**Figura 1**), e as diamidinas de hora em hora por meses<sup>23</sup>. As biguanidas agem predominantemente sobre a forma cística do protozoário.

Soma-se o fato da indicação clínica do uso de corticoide associado com a terapia antimicrobiana também ser controversa, não havendo padronização referente à classe de droga a ser utilizada e a concentração necessária. O Fosfato de Dexametasona, cujo peso molecular é de 392g/mol (**Figura 2**), e o Acetato de Prednisolona, de peso molecular de 360 g/mol (**Figura 3**), são potentes glicocorticoides halogenados amplamente empregados nas patologias oftalmológicas. Os corticosteroides variam em sua potência anti-inflamatória, tendo a dexametasona ação *in vitro* 5-7 vezes maior que a prednisolona. No entanto, sabe-se que não se pode extrapolar essas diferenças para uma situação *in vivo*, como o microambiente corneano, uma vez que o Acetato de Prednisolona é lipofílico e, portanto, penetra melhor a córnea intacta quando comparado a uma preparação hidrofílicas, como é o caso do Fosfato de Dexametasona<sup>24</sup>.

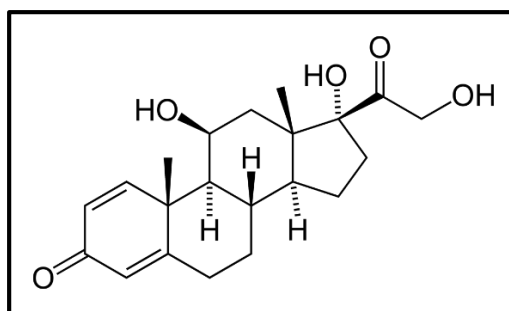
Embora o uso de esteroides tópicos possa prolongar o tempo de tratamento da CA, a indicação terapêutica destes compostos é sugerida em casos de maior severidade infecciosa, a fim de atenuar o processo inflamatório, como por exemplo situações de esclerite ou uveíte associadas à infecção. Assim, este estudo poderá contribuir de forma substancial na padronização do uso dos biocidas e corticóides disponíveis através do conhecimento do mecanismo de ação no microambiente celular da córnea.



**Figura 1.** Fórmula molecular da Polihexametileno Biguanida (PHMB)



**Figura 2.** Fórmula molecular do Fosfato de Dexametasona



**Figura 3.** Fórmula molecular do Acetato de Prednisolona

## 5. JUSTIFICATIVA

A pesquisa translacional se caracteriza como o avanço da ciência aplicado ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, drogas e ou técnicas de intervenção terapêutica junto às pacientes estabelecidos na compreensão do desenvolvimento da doença e sua progressão. A evolução da pesquisa translacional na área de oftalmologia está construindo uma medicina de maior eficácia na prevenção e tratamento individualizado formando os ingredientes básicos da almejada medicina personalizada.

No processo translacional tradicional, a investigação básica é o primeiro passo para a identificação de novos mecanismos de infecção e potenciais alvos para terapias elaboradas em ensaio experimentais e eventualmente validadas num ensaio clínico específico. Uma vez estabelecido e padronizado um processo ou produto na rotina terapêutica, novas provas e conceitos podem surgir levando a comunidade acadêmica a uma análise crítica sobre potenciais aplicações complementares ou melhorias qualitativas quanto à aplicabilidade de um determinado processo ou produto no paciente durante a prática clínica.

A partir da aplicabilidade da investigação científica no campo da pesquisa translacional e a estreita relação com a melhoria nos padrões de cuidado à saúde dos pacientes, foi sugerido o conceito de medicina de precisão. A Medicina de precisão é uma abordagem única à prática clínica na qual os aspectos individuais de um doente são considerados diretamente para dirigir o plano de tratamento, incluindo a sua constituição genética, biomarcadores principais, história de tratamento anterior, fatores ambientais e preferências comportamentais.



Esta abordagem permite uma resposta otimizada à terapêutica permitindo aos médicos prescreverem tratamentos personalizados segundo as características específicas apresentadas por uma determinada patologia, maximizando o efeito terapêutico no paciente e minimizando possíveis efeitos colaterais.

Portanto, esse processo visa descobrir e desenvolver novos tratamentos para determinados grupos de pacientes que apresentarão melhores respostas terapêuticas. Por exemplo, na ceratite parasitária por amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba*, o uso de corticoides associados ou não a colírios antimicrobianos no tratamento é controverso e não-padronizado, possibilitando ampla discussão sobre aplicabilidades da pesquisa translacional e medicina de precisão.

A *Acanthamoeba* spp em sua forma de trofozoito é sensível a diversos medicamentos disponíveis na atualidade, como antibióticos, anti-sépticos, antifúngicos, antiprotozoários, antivirais e terapias antineoplásicas. Entretanto, a forma cística do parasita pode ocasionar uma infecção prolongada e resistente, contra a qual é ineficaz a maioria das drogas supracitadas. Os cistos apresentam alta resistência *in vitro*, por exemplo, ao imidazol e aos antifúngicos, sendo as biguanidas os cisticidas mais eficazes nesta condição.<sup>25, 26</sup> As biguanidas interagem com a membrana citoplasmática do protozoário, resultando em perda de componentes celulares e inibição de enzimas respiratórias.<sup>27</sup>

As diamidinas e as biguanidas são atualmente os cisticidas mais eficazes *in vitro* e por esta razão o uso de biguanidas associado ou não a diamidinas é tido como o tratamento padrão-ouro da CA.<sup>28</sup> No entanto, nota-se não haver uma correlação clinicopatológica satisfatória entre a sensibilidade *in vitro* da *Acanthamoeba* aos biocidas

e a observada na prática clínica. Neste contexto, o tratamento pode falhar mesmo usando-se uma medicação cuja composição seja de 10 a 60 vezes a concentração cisticida mínima observada em ambiente laboratorial. Algumas das hipóteses aventadas para justificar esta condição são de que uma dose terapêutica intra-estromal não esteja sendo atingida, que a droga se ligue a componentes tissulares que a inativem ou que o protozoário seja mais resistente em ambiente *in vivo* do que *in vitro*.<sup>29,30</sup>

Além disso, apesar da grande controvérsia associada ao uso de corticosteroides nas complicações inflamatória da CA, há evidências na literatura do benefício da corticoterapia tópica no tratamento da dor, não havendo associação com piora do prognóstico visual quando iniciado após um biocida moderno, como a biguanida.<sup>31</sup> Os corticoides muitas vezes são prescritos para a CA após um período de terapia com biocidas em casos com inflamação persistente evidenciada por esclerite, reação de câmara anterior, infiltrado em anel ou coriorretinite. Todos estes achados são normalmente associados a dor intensa e podem resultar em perda visual permanente.<sup>27</sup>

Neste plano de trabalho, utilizamos a ceratite parasitária por *Acanthamoeba* spp como modelo de estudo e avaliamos a relação da concentração e tempo de contato da PHMB no padrão de toxicidade de linhagens celulares da córnea, como célula epitelial e ceratócito. O efeito de corticóides comercialmente disponíveis e utilizados na prática clínica também foi estudado quanto ao aspecto morfológico, fisiológico, metabólico e viabilidade do protozoário e linhagens celulares de córnea.

Os ensaios experimentais foram realizados em triplicata e os resultados analisados estatisticamente quanto ao grau de significância. A partir deste projeto de pesquisa, esperamos obter resultados indicativos para o desenvolvimento de potenciais

ferramentas biotecnológicas voltadas a precisão e especificidade terapêutica, minimizando os efeitos citotóxicos teciduais e, conseqüentemente, proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente.

## **6. OBJETIVOS**

OBJETIVO GERAL. Estudar o efeito do corticoide e/ ou do biocida PHMB em um microambiente experimental das células epiteliais e estromais da cornea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS. Quantificar o metabolismo celular das HCEC e SIRC quando expostas a Fosfato de Dexametasona 0,1% ou Acetato de Prednisolona 1% e avaliar a citotoxicidade relacionada a concentração no uso de PHMB isolado ou associado ao corticosteroide também em concentrados experimentais de HCEC ou SIRC.

## 7. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, sob o número 559063. O estudo foi realizada de janeiro de 2013 a dezembro de 2015.

Meios de cultura contendo linhagens celulares certificadas de epitélio da córnea humana (HCEC, Life Technologies Corporation) e ceratócitos de coelho (SIRC, ATCC CCL60<sup>®</sup>) foram utilizados nos ensaios experimentais com a finalidade de reproduzir as condições *in vitro* do microambiente da córnea. As HCEC são células epiteliais humanas normais isoladas da região do limbo corneano e submetidas a criopreservação. Elas são ideais para o estudo da biologia da inflamação, cicatrização de feridas e da reação celular a agressores físicos e químicos da córnea. Já as SIRC exibem um fenótipo de fibroblastos, o que permite a sua utilização como um modelo experimental do estroma corneano.<sup>32</sup>

Uma concentração de  $2 \times 10^5$  células / mL de HCEC ou SIRC foram semeadas em placas contendo meios de cultura adequados e tratadas com a adição de corticosteróides Fosfato de Dexametasona na concentração de 0,1% (50 µL) ou Acetato de Prednisolona na concentração de 1% (50 µL) e/ ou PHMB na concentração de 0,02% ou 0,04% (50 µL). Todas as drogas foram manipuladas sem a adição de conservantes para evitar viés no estudo vide a toxicidade causada por estes compostos.<sup>33</sup> O veículo utilizado na confecção dos compostos foi o Alcool Polivinílico.

Os ambientes analisados foram os seguintes: meio de cultura de HCEC ou SIRC (condição 1), HCEC ou SIRC isoladas (condição 2), as células mais uma solução de soro fisiológico (condição 3), células mais PHMB 0,02% ou 0,04% (condições 4 e 5), células

mais prednisolona ou dexametasona (condições 6 e 7) e por fim placas combinadas de células mais PHMB 0,02% ou 0,04 % associado a prednisolona ou dexametasona (condições 8 a 11) (**Tabela 1**).

O metabolismo celular foi quantificado através de fluorescência emitida com o auxílio do reagente PrestoBlue<sup>®</sup>. O PrestoBlue<sup>®</sup> foi desenvolvido recentemente com a finalidade de detectar *in vitro* a citotoxicidade e a viabilidade celular. Ele é um composto à base de resazurina que é convertido para a forma reduzida por enzimas mitocondriais de células viáveis nos sistemas testados. Como consequência da redução, o reagente apresenta uma mudança de sua coloração, assim como de sua fluorescência, podendo esta ser quantificada utilizando-se qualquer abordagem colorimétrica ou espectrofotometria.<sup>34</sup>

Analisou-se o períodos de 6 horas após a inoculação dos compostos químicos e de 3 horas após a retirada dos reagentes por acreditar-se serem estes tempos suficientes para análise da ação das drogas e do restabelecimento do metabolismo celular, respectivamente. Todo o estudo foi conduzido em triplicata no Laboratório de Protozoologia Ocular (LAPRO) do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP-EPM. As leituras foram feitas por meio de estudo espectrofotométrico em microscópio de luz UV e citometria de fluxo

As diferenças entre os meios de cultura foram analisadas através do teste estatístico de ANOVA de 2 vias a fim de detectar-se a influência de diversos fatores na característica de interesse. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SPSS, versão 21.

CONDIÇÕES	COMPOSIÇÃO
1	Meio de cultura de HCEC/ SIRC
2	HCEC/ SIRC
3	HCEC/ SIRC + solução salina
4	HCEC/ SIRC + PHMB 0,02%
5	HCEC/ SIRC + PHMB 0,04%
6	HCEC/ SIRC + Pred 1,0%
7	HCEC/ SIRC + Dexa 0,1%
8	HCEC/ SIRC + PHMB 0,02% + Pred 1,0%
9	HCEC/ SIRC + PHMB 0,04% + Pred 1,0%
10	HCEC/ SIRC + PHMB 0,02% + Dexa 0,1%
11	HCEC/ SIRC + PHMB 0,04% + Dexa 0,1%

**Tabela 1.** Microambientes analisados em modelo experimental no estudo. Dexa (Fosfato de Dexametasona), Pred (Acetato de Prednisolona), PHMB (Polihexametil Biguanida), HCEC (células epiteliais corneanas), SIRC (fibroblastos corneanos de coelho).

## 8. RESULTADOS

A taxa de metabolismo celular não diferiu entre os meios de HCEC e SIRC após 6 horas e no período de recuperação de 3 horas após retirada da exposição aos corticosteróides e associações a PHMB 0,02% ou 0,04%. A viabilidade celular após a retiradas das medicações aumentou significativamente na condição de PHMB 0,02% acrescido de prednisolona (Pred) para as HCEC e PHMB 0,04% acrescido de dexametasona (Dexa) para as SIRC ( $p < 0,05$ , ambos) (**Tabela 2**).

Completadas 6 horas de incubação, os meios suplementados com Pred ou Dexa demonstraram ser menos tóxicos para HCEC do que o meio com PHMB 0,02% ou 0,04% isoladamente ou em associação com Pred ou Dexa ( $p < 0,001$ ) (**Tabela 3 e Figura 4**). O metabolismo das SIRC, quer após 6 horas ou no período de recuperação, foi maior no meio com PHMB 0,02% sozinho do que em associação com corticosteróides ( $p < 0,001$ ). Comparando com as outras condições experimentais, menor taxa metabólica foi verificada nas SIRC com PHMB 0,04% isolado do que em placas com corticosteróide isolado ( $p < 0,001$ ). Soma-se o fato de que todas as terapias combinadas foram mais tóxicos para SIRC nos períodos de 6 horas e no período de recuperação ( $p < 0,001$ ) (**tabelas 4 e 5 e Figura 4**).

A **figura 4** ilustra o metabolismo celular percentual quantificado através da fluorescência com base na condição que apresentou maior taxa metabólica durante o estudo. Já a **figura 5** apresenta uma análise comparativa do metabolismo celular entre as 6 horas e o período de recuperação nos meios de HCEC e SIRC.



	6 horas		Recuperação		
	Média (X10 <sup>5</sup> )	DP (X10 <sup>5</sup> )	Média (X10 <sup>5</sup> )	DP (X10 <sup>5</sup> )	p
HCEC + PHMB 0,04 % + Pred	26,5	6,3	29,9	7,0	<0,01
SIRC + PHMB 0,04% + Dexa	-7,6	3,9	2,7	0,7	0,04

**Tabela 2.** Comparação dos períodos de 6 horas e de recuperação das HCEC e SIRC, considerando-se a mesma condição de estudo experimental. Dexa (Fosfato de Dexametasona), Pred (Acetato de Prednisolona), PHMB (Polihexametil Biguanida), HCEC (células epiteliais corneanas), SIRC (fibroblastos corneanos de coelho).

HCEC 6 horas		
Ambiente 1	Ambiente 2	p
PHMB 0,02 %	Pred	<0,01
PHMB 0,02 %	Dexa	<0,01
PHMB 0,04 %	Pred	<0,01
PHMB 0,04 %	Dexa	<0,01
PHMB 0,02 % + Pred	Pred	<0,01
PHMB 0,02 % + Pred	Dexa	<0,01
PHMB 0,04 % + Pred	Pred	<0,01
PHMB 0,04 % + Pred	Dexa	<0,01
PHMB 0,02 % + Dexa	Pred	<0,01
PHMB 0,02 % + Dexa	Dexa	<0,01
PHMB 0,04 % + Dexa	Pred	<0,01
PHMB 0,04 % + Dexa	Dexa	<0,01

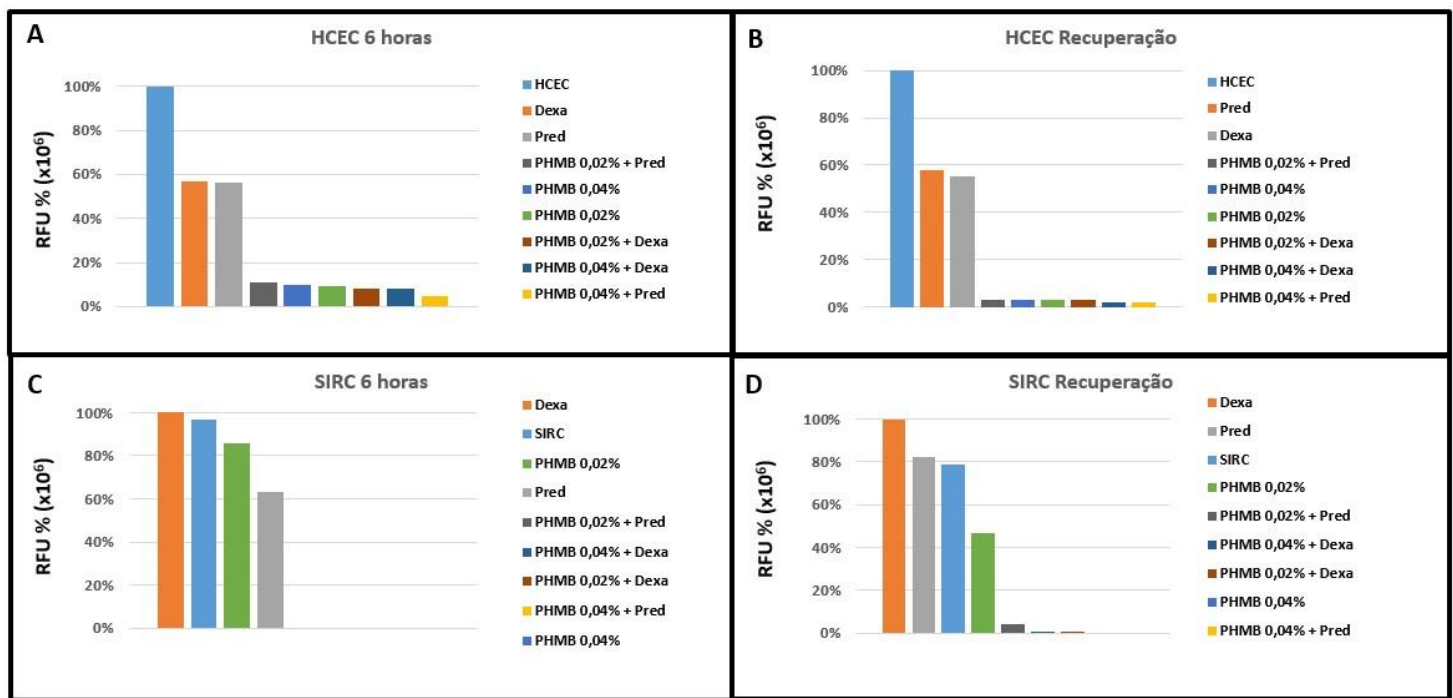
**Tabela 3.** Comparação entre os meios das HCEC expostos a diferentes combinações de compostos químicos após 6 horas. Dexa (Fosfato de Dexametasona), Pred (Acetato de Prednisolona), PHMB (Polihexametil Biguanida), HCEC (células epiteliais corneanas), SIRC (fibroblastos corneanos de coelho).

SIRC 6 horas		
Ambiente 1	Ambiente 2	p
PHMB 0,02 %	PHMB 0,04 %	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,02 % + Pred	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,04 % + Pred	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,02 % + Dexa	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,04 % + Dexa	<0,01
PHMB 0,04 %	Pred	<0,01
PHMB 0,04 %	Dexa	<0,01
Pred	PHMB 0,02 % + Pred	<0,01
Pred	PHMB 0,04 % + Pred	<0,01
Pred	PHMB 0,02 % + Dexa	<0,01
Pred	PHMB 0,04 % + Dexa	<0,01
Dexa	PHMB 0,02 % + Pred	<0,01

**Tabela 4.** Comparação entre os meios das SIRC expostos a diferentes combinações de compostos químicos após 6 horas. Dexa (Fosfato de Dexametasona), Pred (Acetato de Prednisolona), PHMB (Polihexametil Biguanida), HCEC (células epiteliais corneanas), SIRC (fibroblastos corneanos de coelho).

SIRC Recuperação		
Ambiente 1	Ambiente 2	p
PHMB 0,02 %	PHMB 0,04 %	<0,01
PHMB 0,02 %	Pred	<0,01
PHMB 0,02 %	Dexa	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,02 % + Pred	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,04 % + Pred	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,02 % + Dexa	<0,01
PHMB 0,02 %	PHMB 0,04 % + Dexa	<0,01
PHMB 0,04 %	Pred	<0,01
PHMB 0,04 %	Dexa	<0,01
Pred	PHMB 0,02 % + Pred	<0,01
Pred	PHMB 0,04 % + Pred	<0,01
Pred	PHMB 0,02 % + Dexa	<0,01
Pred	PHMB 0,04 % + Dexa	<0,01
Dexa	PHMB 0,02 % + Pred	<0,01
Dexa	PHMB 0,04 % + Pred	<0,01
Dexa	PHMB 0,02 % + Dexa	<0,01
Dexa	PHMB 0,04 % + Dexa	<0,01

**Tabela 5.** Comparação entre os meios das SIRC expostos a diferentes combinações de compostos químicos após 3 horas de recuperação. Dexa (Fosfato de Dexametasona), Pred (Acetato de Prednisolona), PHMB (Polihexametil Biguanida), HCEC (células epiteliais corneanas), SIRC (fibroblastos corneanos de coelho).



**Figura 4:** Quantificação percentual do metabolismo celular através de fluorescência com base no meio de maior viabilidade celular.

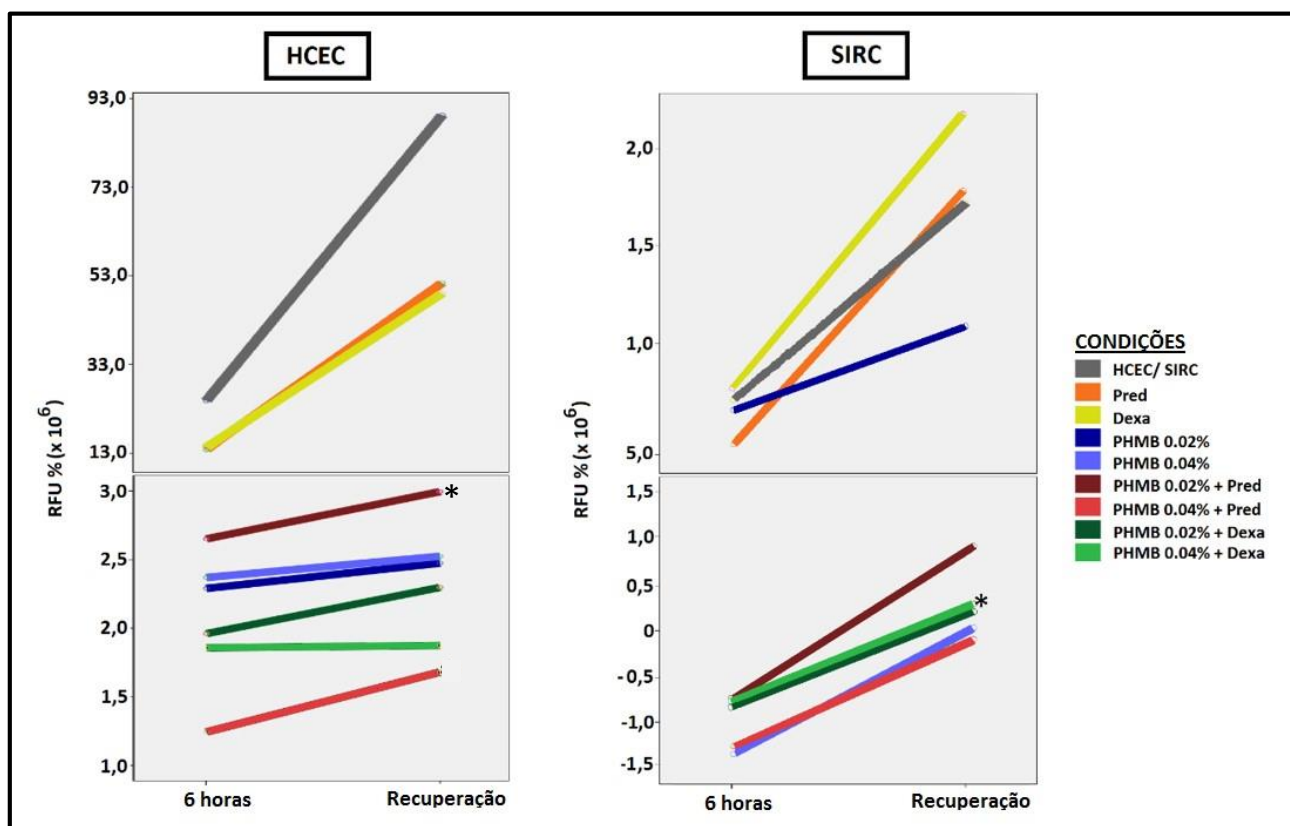
4A. Metabolismo percentual das HCEC às 6 horas

4B. Metabolismo percentual das HCEC no período de recuperação

4C. Metabolismo percentual das SIRC às 6 horas

4D. Metabolismo percentual das SIRC no período de recuperação.

Dexa (Fosfato de Dexametasona), Pred (Acetato de Prednisolona), PHMB (Polihexametil Biguanida), HCEC (células epiteliais corneanas), SIRC (fibroblastos corneanos de coelho).



**Figura 5:** Análise comparativa dos metabolismos celulares entre as 6 horas e o período de recuperação nos meios das HCEC e SIRC. Dexa (Fosfato de Dexametasona), Pred (Acetato de Prednisolona), PHMB (Polihexametil Biguanida), HCEC (células epiteliais corneanas), SIRC (fibroblastos corneanos de coelho), \* ( $p < 0,05$ ).

## 9. DISCUSSÃO

Com o intuito de determinar a interação da PHMB e/ou dos corticoides (Fosfato de Dexametasona 0,1% e Acetato de Prednisolona 1,0%) no metabolismo celular da córnea, foram utilizadas as HCEC e as SIRC. Estas células reproduzem o microambiente corneano em termos de epitélio e estroma, respectivamente, e são ideais para o estudo da reprodução de CA em vitro <sup>32</sup>.

Há grande controversia sobre a questão da padronização da terapêutica da CA, entretanto, as biguanidas são tidas como a principal classe de drogas empregadas para esse fim, podendo ser prescritas como monoterapia ou associadas a outras medicações. Dentre as drogas utilizadas como coadjuvantes, os corticoides representam uma classe cuja indicação e posologia carecem de dados objetivos na literatura atual <sup>35</sup>. Não é bem estabelecido, por exemplo, se os corticoides atuam direta ou indiretamente sobre o metabolismo do parasita e se o uso dessa classe de drogas pode prolongar o tempo de doença. Uma tendência é o uso de corticosteroides em casos cujas inflamação se torna exuberante, a fim de combater uma resposta imune danosa por parte do paciente.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir ser semelhante o comportamento das células do epitélio e do estroma corneano no que diz respeito a suscetibilidade a toxicidade das medicações empregadas no experimento descrito, sendo que a mesma semelhança se aplica a taxa de recuperação metabólica quando foi interrompida a exposição aos compostos químicos.

Entretanto, quando se compara os diferentes tempos de estudo, nota-se que as células epiteliais apenas conseguiram se recuperar de modo significativo quando

expostas a PHMB 0,02% associado a prednisolona. Já nos casos das SIRC, uma melhora metabólica significativa foi observada apenas nas células expostas a PHMB 0,04% associadas a dexametasona. Este fato sugere uma maior resistência destes tipos celulares aos compostos associados descritos.

Conclui-se também que a toxicidade dos corticoides empregados é significativamente menor que a da PHMB tanto nas HCEC quanto nas SIRC e em todos os tempos de estudo. Este dado contraria a ideia de que os corticoides devem ser evitados na terapia da CA devido ao dano direto ao tecido corneano, e talvez fundamente uma ampliação da indicação desta classe de medicação para casos em que a inflamação não seja um aspecto tão relevante na apresentação da doença.

Por fim, deve-se preferir a utilização da menor quantidade de medicações e nas menor concentração possível que seja capaz de controlar a doença, pois notou-se que o acréscimo de medicações e o aumento da posologia das drogas empregadas, no caso do estudo PHMB 0,02 e 0,04%, causou maior dano celular corneano.

Em suma, demonstrou-se que a toxicidade da biguanida é maior do que o dos corticosteróides para as HCEC e SIRC, e que a combinação dos dois fármacos não melhorar esta taxa de dano celular. Depois de retirar os medicamentos a partir do meio de cultura, houve uma tendência a recuperação metabólica celular. O presente estudo contribui na padronização do uso e indicação de biocidas e corticosteróides disponíveis, além de auxiliar no melhor conhecimento do seu mecanismo de ação a nível celular na córnea e as possíveis implicações para a fisiopatologia da doença.



## **10. ADEQUAÇÃO E PROMOÇÃO DO ESTUDO PROPOSTO PARA O MESTRADO PROFISSIONAL DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E CIÊNCIAS VISUAIS, EPM-UNIFESP.**

A partir do presente estudo, evidenciou-se que a toxicidade dos corticoides tópicos às células da córnea é inferior à da PHMB, droga amplamente utilizada no tratamento de ceratite por *Acanthamoeba* spp. Entretanto, deve-se realizar uma análise em trabalhos futuros do efeito dos corticoides no metabolismo da *Acanthamoeba* spp antes de se sugerir uma ampliação da indicação do uso desta classe de medicação no tratamento da CA. Com relação à escolha do tipo de corticoides, o Acetato de Prednisolona 1% e a Dexametasona 0,1% apresentaram comportamento semelhante a nível celular.

Além disso, observou-se ser reversível a toxicidade medicamentosa no microambiente corneano após a suspensão das drogas comumente empregadas na CA. Por fim, uma vez optado por uma terapia combinada de corticoide e PHMB, sugere-se o uso de PHMB na concentração de 0,02%, de modo que o uso da PHMB 0,04% mostrou ser lesiva ao metabolismo celular da córnea. É importante salientar que novos estudos devem ser conduzidos com o intuito de se quantificar a concentração final de PHMB nas diferentes camadas do tecido da córnea após a sua instilação.

Os dados expostos são de grande impacto no campo social e de saúde, uma vez que o tratamento da CA carece de uma normatização na literatura no que diz respeito principalmente às drogas que devem ser empregadas, sua concentração e sua posologia. Dessa forma, o presente estudo norteia um padrão terapêutico presuntivo do uso dos biocidas e corticoides disponíveis atualmente, através no conhecimento do mecanismo de ação no microambiente metabólico das células corneanas.

## **11. CONCLUSÃO**

Com base no presente estudo, pode-se concluir que a PHMB isoladamente ou em associação com corticosteróides apresenta uma maior toxicidade quando comparada aos corticoides isolados, tanto para as HCEC quanto para as SIRC. Notou-se uma tendência para a recuperação metabólica celular após a retirada do meio de cultura das biguanidas e / ou dos corticosteróides. Esta tese contribui para evidenciar que o acréscimo de corticosteróides não altera consideravelmente o grau de toxicidade da PHMB às células da córnea. Não obstante, PHMB 0,02% é preferível nos casos de terapia combinada na CA.

## 12. ANEXOS

### CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 29 de agosto de 2013  
CEP N 559083

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Denise De Freitas  
Depto/Disc: Oftalmologia  
Denise De Freitas (orientador)

Título do projeto: "Pesquisa translacional reversa e medicina de precisão em Oftalmologia e Ciências Visuais".

#### Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

O estudo pretende estudar os fatores moleculares envolvidos nas disfunções associadas a diferentes estruturas do olho, visando potenciais aplicações no diagnóstico precoce e processos terapêuticos. Para isso, serão utilizadas técnicas de biologia celular e molecular, utilizando células imortalizadas, comercialmente disponíveis, segundo a estrutura do olho que se pretende estudar, e microrganismos isolados. O estudo é relevante para o desenvolvimento de linhas de pesquisa voltadas aos processos celulares e moleculares envolvidos em diferentes campos de estudo da oftalmologia e ciências visuais, como córnea e anexos, retina, estrabismo e glaucoma.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 22/08/2013, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. External Disease and Cornea In: Reidy JJ, ed. American Academy of Ophthalmology. San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2011 - 2012.
2. Goldstein MH. Córnea e doenças da superfície ocular. In: Yanoff M, Duker, J.S., ed. Oftalmologia. 3rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011:203-378.
3. Nishida T, Saika, S. Cornea and sclera: anatomy and physiology. In: Krachmer JH, Mannis, M.J., Holland, E.J., ed. Cornea-Fundamentals, Diagnosis e and Management. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2011.
4. Keay L, Edwards K, Naduvilath T, et al. Microbial keratitis predisposing factors and morbidity. Ophthalmology 2006 Jan;113(1):109-16.
5. Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. Acanthamoeba spp polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Trans Ophthalmol Soc U K 1975 Jul;95(2):221-32.
6. Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. Lancet 1974 Dec 28;2(7896):1537-40.
7. Lorenzo-Morales J, Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Pinero JE, Valladares B. Acanthamoeba spp keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? Trends Parasitol 2013 Apr;29(4):181-7.

8. Pacella E, La Torre G, De Giusti M, et al. Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* spp keratitis. *Clin Ophthalmol* 2013;7:991-4.
9. Graffi S, Peretz A, Jabaly H, Naftali M. *Acanthamoeba* spp keratitis. *Isr Med Assoc J* 2013 Apr;15(4):182-5.
10. Carvalho FR, Foronda AS, Mannis MJ, Hofling-Lima AL, Belfort R, Jr., de Freitas D. Twenty years of *Acanthamoeba* spp keratitis. *Cornea* 2009 Jun;28(5):516-9.
11. Morlet N, Duguid G, Radford C, Matheson M, Dart J. Incidence of *Acanthamoeba* spp keratitis associated with contact lens wear. *Lancet* 1997 Aug 9;350(9075):414.
12. Seal DV. *Acanthamoeba* spp keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)* 2003 Nov;17(8):893-905.
13. Cariello AJ, Passos RM, Yu MC, Hofling-Lima AL. Microbial keratitis at a referral center in Brazil. *Int Ophthalmol* 2011 Jun;31(3):197-204.
14. Heredero-Bermejo I, Sánchez-Nieves J, Soliveri J, Gómez R, de la Mata FJ, CopaPatiño JL, Pérez-Serrano J. In vitro anti-*Acanthamoeba* spp synergistic effect of chlorhexidine and cationic carbosilane dendrimers against both trophozoite and cyst forms. *Int J Pharm.* 2016 May 9. pii: S0378-5173(16)30384-2.
15. Greenwell TH, Loh RS, Chehade M, Mills RA. Misdiagnosis of orthokeratology-related *Acanthamoeba* spp keratitis as herpes simplex virus keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2013 May;41(4):418-20.

16. Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea* 2000 Sep;19(5):712-22.
17. Page MA, Mathers WD. Acanthamoeba spp keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. *J Ophthalmol* 2013;2013:670242.
18. Younger JR, Johnson RD, Holland GN, et al. Microbiologic and histopathologic assessment of corneal biopsies in the evaluation of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol* 2012 Sep;154(3):512-9 e2.
19. McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Effect of steroids on Acanthamoeba spp cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Nov;42(12):2885-93.
20. Gooi P, Lee-Wing M, Brownstein S, El-Defrawy S, Jackson WB, Mintsoulis G. Acanthamoeba spp keratitis: persistent organisms without inflammation after 1 year of topical chlorhexidine. *Cornea* 2008 Feb;27(2):246-8.
21. Herz NL, Matoba AY, Wilhelmus KR. Rapidly progressive cataract and iris atrophy during treatment of Acanthamoeba spp keratitis. *Ophthalmology* 2008 May;115(5):866-9.
22. Iovieno A, Oechsler RA, Ledee DR, Miller D, Alfonso EC. Drug-resistant severe Acanthamoeba spp keratitis caused by rare T5 Acanthamoeba spp genotype. *Eye Contact Lens* 2010 May;36(3):183-4.

23. Kashiwabuchi RT, Carvalho FR, Khan YA, de Freitas D, Foronda AS, Hirai FE, Campos MS, McDonnell PJ. Assessing efficacy of combined riboflavin and UV-A light (365 nm) treatment of *Acanthamoeba* spp trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Dec 9;52(13):9333-8.
24. Struck HG, Bariszlovich A. Comparison of 0.1% dexamethasone phosphate eye gel (Dexagel) and 1% prednisolone acetate eye suspension in the treatment of postoperative inflammation after cataract surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001 Oct;239(10):737-42.
25. Maycock NJ, Jayaswal R. Update on *Acanthamoeba* spp Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Cornea*. 2016 May;35(5):713-20.
26. Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* spp keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol*. 2013 Apr;29(4):181-7.
27. Dart JK, Saw VP, Kilvington S. *Acanthamoeba* spp keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol*. 2009 Oct;148(4):487-499.e2.
28. Mathers W. Use of higher medication concentrations in the treatment of *Acanthamoeba* spp keratitis. *Arch Ophthalmol*. 2006 Jun;124(6):923.
29. Pérez-Santonja JJ, Kilvington S, Hughes R, Tufail A, Matheson M, Dart JK. Persistently culture positive *Acanthamoeba* spp keratitis: in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmology*. 2003

30. Alkharashi M, Lindsley K, Law HA, Sikder S. Medical interventions for *Acanthamoeba* spp keratitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb 24;(2):CD010792.
31. Carnt N, Robaei D, Watson SL, Minassian DC, Dart JK. The Impact of Topical Corticosteroids Used in Conjunction with Antiamoebic Therapy on the Outcome of *Acanthamoeba* spp Keratitis. *Ophthalmology*. 2016 May;123(5):984-90.
32. Toropainen E, Ranta VP, Talvitie A, Suhonen P, Urtti A. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Nov;42(12):2942-8.
33. Tu EY, Shoff ME, Gao W, Joslin CE. Effect of low concentrations of benzalkonium chloride on *Acanthamoeba* spp survival and its potential impact on empirical therapy of infectious keratitis. *JAMA Ophthalmol*. 2013 May;131(5):595-600.
34. Boncler M, Róžalski M, Krajewska U, Podsedek A, Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of antiproliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2014 Jan-Feb;69(1):9-16.
35. Kowalski RP, Abdel Aziz S, Romanowski EG, Shanks RM, Nau AC, Raju LV. Development of a practical complete-kill assay to evaluate anti-*Acanthamoeba* spp drugs. *JAMA Ophthalmol*. 2013 Nov;131(11):1459-62.